

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

[emblem]

Certification

Messrs. Günther Maierhofer in 8000 Munich
and Gregor Cevc in 8011 Heimstetten filed a patent application with the title

"Method for the production of liposomes"

with the German Patent Office on August 24, 1990.

The attached document is a correct and accurate reproduction of the original document in this patent application.

The attached Abstract, which is to be attached to the application, but is not an integral part of the application, agrees with the original filed on August 24, 1990.

In the German Patent Office, the application received the symbols C 07 F 9/10 and A 61 K 9/127 of the International Patent Classification, for the time being.

Munich, November 4, 1991

The President of the German Patent Office

Officially

[signature]

[name stamp:] Maget

[seal]

File No.: P 40 26 833.0

[two punched date stamps at top of all subsequent pages,
August 24, 1990, and [illegible] 1991]

13

[seal of German Patent Office]

ABSTRACT

The invention relates to a method for the production of liposomes, in which amphiphilic lipids or lipoids that form double layers, as membrane components, are combined, either dissolved in an organic solvent miscible with water, or as such with an aqueous solution of a surfactant substance that can also contain the active substance to be encapsulated, if necessary, and the heterogeneous mixture obtained in this manner is subsequently allowed to pass through a filter.

[letterhead of European Patent Attorneys Schmied-Kowarzik,
Weinhold, Barz, Dannenberg, Gudel, and Schubert]

[rubber stamp:] Documentation copy
No changes allowed

Wd/Ri/Sz

Günther Maierhofer
Stöcklstr. 5a
8000 Munich 60

and

Gregor Cevc
Gruberstr. 62
8011 Heimstetten

Method for the production of liposomes

Method for the production of liposomes

The object of the present invention is a method for the production and the use, on location, of liposomes, which method can also be used on an industrial scale.

Liposomes are spherical vesicles consisting of one or more lipid double layers having an aqueous core. Because of this structure, liposomes are interesting not only as model systems for studying biological membranes, but also as carriers of a large number of substances that are soluble in water, amphiphilic, and lipophilic, since such substances can be both introduced into the vesicle interior and embedded onto or into the vesicle wall. Accordingly, the use of liposomes is gaining increasing importance in many areas, such as medicine, molecular biology, biotechnology, process technology, and even solid bodies technology.

For many applications, large amounts of liposomes are needed, under some circumstances, with strict requirements concerning size, polydispersibility, charge, biological and chemical tolerance, stability, etc., being established, in part. Furthermore, the liposome preparations should frequently be produced and stored in sterile manner. However, most production methods were developed for laboratory purposes and are difficult to transfer to a large technical scale, in many cases.

At present, three different basic methods are used for the production of liposomes.

In what is called the detergent method, detergents are added to the components that form the membranes, as solution mediators, causing a water-soluble suspension of mixed micelles to be formed. The detergents are then removed by means of various methods, e.g. dialysis, pH jump or temperature jump, causing vesicle formation to be initiated. A particular embodiment of this detergent method is described in EP 56 781 and proposed for the production of liposomes on an industrial scale. However, the use of detergents and their subsequent removal from the suspension of the mixed micelles is very material-intensive and time-consuming.

In the case of injection methods, solutions of the membrane components that form the double layers are injected into an aqueous solution in an organic solvent, e.g. in ether or

ethanol. However, this method is not suitable for the production of highly concentrated vesicle suspensions, and since the organic solvent can only be removed incompletely, biologically problematic residue components frequently remain in the preparation. Another disadvantage lies in the fact that the liposome suspensions obtained are generally very heterogeneous.

In the case of mechanical methods, the liposomes are obtained by means of shaking, more or less vigorous mixing, collision and/or ultrasound treatment of double-layer substances in a heterogeneous aqueous suspension. However, these methods are energy-intensive, in most cases, and not very gentle, so that they can easily lead to overheating or to partial decomposition of the membrane-forming substances or of the active substances to be enclosed. EP-A-102 324 [underlined by hand, check mark added], as an example of such a mechanical method, describes the use of anionic or cationic surfactants, in order to lower the need for supplying outside energy, but this method requires the prior formation of a thin film of membrane components and surfactants on the vessel surface, and therefore necessarily restricts the size of the preparation batch.

The international application WO 86/00238 [underlined by hand, check mark added] describes a technique for the production of liposomes having a homogeneous size distribution, by means of extrusion through one or more filters. However, the method is only suitable for separating or fragmenting liposomes that were formed previously. It requires the use of high pressures, and leads to lipid loss, for example, and therefore to accompanying filter clogging.

It is therefore the task of the present invention to make available a method which can be used to produce homogeneous, concentrated, and, if necessary, sterile liposome suspensions, even in large amounts, within a short period of time and in simple and gentle manner.

According to the invention, this task is accomplished by means of a method according to claim 1.

[Inserted: It is practical if] the membrane components that form the double layer of the liposome are amphiphilic lipoids or lipid substances having the general basic structure X-Y, where X represents a polar head group and Y represents an apolar radical. Typically, the membrane components are lipids, preferably from the group of phospholipids, e.g. phosphatidyl ethanolamine, phosphatidic acid, phosphatidyl glycerin, phosphatidyl choline, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol; of glycolipids, e.g. gangliosides or globosides and their sphingolipids, e.g. sphingomyelins and cerebroside.

However, artificially produced lipids that do not occur in biological systems, or mixtures of such lipids with natural ones, can be used for the same purpose. The two-chain derivatives that carry a phosphate group or sulfate group, molecules that are coupled to a disaccharide or oligosaccharide, substances that are linked with an oligopeptide or carry one or more polymer radicals (such as polyoxyethylene, for example), should be particularly mentioned.

To reduce the energy required for vesiculation, these membrane components are used together with one or more surfactant substances that [inserted: can] have the same structural basic type X-Y, as indicated above with regard to the membrane components. For special embodiments of the invention, it can therefore occur that membrane components that form double layers and the surfactant substance are identical, or that the membrane components become surfactant by means of the addition of non-lipoid substances. The head group of such surfactant molecules can be anionic, cationic, zwitterionic, or non-ionic. The compounds can be used both individual and in a mixture.

Examples of anionic head groups are carboxylates, sulfates, sulfonates, etc. Cationic groups mostly contain different amino derivatives and derivations of positively charged amino acids. Examples for this are e.g. alkyl ammonium bromide, alkyl mono and dimethylolide, lysine derivatives, etc. The hydrophobic component generally consists of hydrocarbon chains (e.g. alkyl or alkenoyl, acyl, etc.), steroids or their substituents, cholamidopropyl derivatives, cholates (glycocolate, glycodeoxycholate, taurocholate, deoxycholate, etc.), and many others. They can be straight-chained, branched, aliphatically substituted, saturated, or partially saturated. Zwitterionic groups contain both positively charged and negatively charged groups. Examples of this are amino alcohol esters of phosphatidic acid, corresponding thio compounds, betaines, sulfobetaines, corresponding amino acid derivatives, etc. Many lysophospholipids also belong to this group. The head groups of the non-ionic amphiphiles mainly contain hydroxyl groups and belong to the classes of the polyoxyethylenes or the saccharides, for example. The non-ionic groups are typically bound to the hydrophobic part directly (as in the case of alkyl glucosides or alkyl thioglucosides, for example) or by way of a ring structure (as in the case of digitonin, Triton, Tween, etc., for example).

According to the invention, it is practical to use the following substance classes or modifications of them as surfactant substances:

alkyl glucosides, alkyl thioglucosides, alkyl maltosides, alkyl dimethyl aminoxides, betaines and their quaternary derivatives, digitonins or gallic acids, glucamides, diverse substituents of polyoxyethylenes, CAHP or Big CHAP detergents, lysolipids or lysophospholipids, as well as amphiphilic oligopeptides and polypeptides. Representatives of these substance classes are, for example, polyoxyalkyl ether (commercially available under the name Brij 35, Brij 56, for example), octaethylene glycol monododecyl ether, nonaethylene glycol monododecyl ether, cetyl trimethyl ammonium salts, n-octyl-N,N-dimethyl glycine, dodecyl maltoside and glucoside, dodecyl dimethyl aminoxide, polyoxyethylene isotridecyl ether, polyoxyethylene monolauryl ether, decaoxyethylene monolauryl ether, lauryl sulfate, digitonin, Big-CHAP, CHAPS, CHAPSO, gramicidin, mellitin, polyoxyethylene lauryl ether (m-Pigen PB), polydocanol (Lubrol-PX), octanoyl methyl glucoside, nonanoyl-N-methyl glucamide, Nonidet P-40, alkyl thioglucoside, taurocholate salts, taurodeoxycholate salts, nonaethylene glycol monododecyl ether (Tessid), nonaethylene glycol octylphenol ether (Triton X-100), heptaethylene glycol octylphenyl ether (Triton X-114), lysolecithin, lysokcephalin, lysophosphatidic acid, n-octyl sulfobetaine and 3-octyl dimethyl ammonium propane-1-oleate, polyoxyethylene sorbitane monolaurate, Pluronic F-127, and many more. Another group that can be assigned to the same basic type, however, are oligopeptides or polypeptides having an asymmetrical distribution of hydrophilic and hydrophobic parts. This group includes, for example, many toxins and pore-forming agents, such as gramicidin, amphotericin, etc. Preferably, surfactant substances from biological sources or biologically non-problematical materials are used; these include bile acids and their derivatives, glucosides, maltosides, and thioglucosides, as well as polyoxyethylene derivatives. Na-cholate, alkyl glucosides, polyoxyethylene derivatives, sorbitol, Brij, octylethylene glycol monododecyl ether, nonaethylene glycol monolauryl ether, Na-deoxycholate, dodecyl maltoside, m-Pigen PB, the Genapol series, as well as the Tween series, are particularly preferred. Big-CHAP, CHAPS, and CHAPSO, Deoxy-Big-CHAP, bis-(2-ethylhexyl)-sodium sulfosuccinate, Genaminox KC, Genapol X-80, X-100, and X-150, Lubrol PX, Mega 8, 9, and 10, N-P 40, Pluronic F-127, Na-taurocholate, tesside and peroxide-free Triton reagents are also very well suited.

In the method according to the invention, the lipids or lipoids as membrane components are combined, either as such or dissolved in a small amount of a suitable solvent that is miscible with

water, with an aqueous solution of the surfactant substances. The aqueous solution can furthermore contain salts and be a physiological saline solution, for example.

If necessary, other usual additives and ancillary substances such as membrane stabilizers (e.g. cholesterol, tocopherol, etc.), preservatives (e.g. antioxidants such as ascorbic acid or antibiotics), colorants, fragrances, agents that change consistency, can be used; these can be introduced into the system at any desired point in time, either together with the membrane components and surfactant substances or separately from them. If necessary, gel-forming agents, e.g. Carbopol, Hostacerin PN 73, Tylose, Rhodigel, etc., can also be added to the liposomal suspension.

Vesicle formation takes place in that the heterogeneous mixture obtained in this manner is allowed to pass through a filter. In this connection, it is practical if the molar ratio L/D of lipid or lipid membrane components (L) to surfactant substances (D) lies between 1 and 20, preferably between 2 and 6, particularly preferably between 3.1 and 5.5. If the L/D values are too low, mixed micelles are obtained; at L/D values greater than 20, the pressure required for filtration increases greatly, and the liposomes produced in this way tend to fuse and aggregate. It is preferable to work at a slight excess pressure of 1 to 6 bar. It is practical if the pore diameter of the filters lies between 0.1 and 0.8 μm , preferably between 0.15 and 0.3 μm . If the liposome preparation is to be obtained in sterile manner, the upper limit of the pore diameter is 0.22 μm .

In this connection, the filter material plays hardly any role. For example, membranes made of cellulose acetate or cellulose nitrate, of pure cellulose, of nylon, of polycarbonate, or membranes on an inorganic basis can be used. The production temperature is adapted to the selection of useful and carrier substances, and [inserted: it is practical if it] lies between 0 and 95°. Preferably, the work is carried out in a temperature range of 18-70°C; for the lipids with fluid chains, the temperature range is particularly preferably between 18 and 38°C, and for the lipids with ordered chains, between 45 and 60°C.

It is practical if the pH lies in a range of 1-10. Preferably, the work is carried out in a pH range between 5.5 and 8, particularly frequently between 6.5 and 7.5.

The active substances to be encapsulated can be added to the system immediately, so that their inclusion takes place spontaneously during formation of the liposomes. However, the

encapsulation of the active substances can take place only after production of the liposomes, in that the finished liposome preparation is introduced into a solvent that contains the active substance or combination of active substances, in each instance, preferably water, or into a liquid active substance itself, with mechanical agitation. The active substances to be encapsulated are not subject to any restriction. Both completely water-soluble and completely non-polar fat-soluble molecules can be enclosed in the lipid vesicles. Preferably, however, more or less amphiphilic active substances are introduced into or onto the vesicles, because such substances guarantee the best stability, paired with an optimal effect. The active substances can be selected, for example, from the area of medications, diagnostics, cosmetics, or biologically active substances. The enclosure yield depends both on the vesicle amphiphiles and on the active substances and other system components, and can amount to more than 80% in the case of water-soluble substances, and up to 100% in the case of fat-soluble substances. If water-insoluble substances are not built directly into the lipid double layer of the liposomes, the lipid to useful substance ratio can go below the value of 1. Preferably, the work is carried out with less than 50% of the useful substance; particularly preferably, the proportions are less than 10% with reference to the basic lipid substance. In the case of water-soluble substances, the "active substance" proportion can be up to 40%; preferably, the work is carried out with less than 15%, particularly preferably the proportion is a few percent with reference to the total volume.

The method according to the invention also allows the immediate production of the liposomal suspension (e.g. of a liposomal medication) directly at the location of administration (e.g. clinical, physician's practice, pharmacy, etc.) or use. Thus, it solves any storage and/or stability problems of the liposomal suspension or the medication. In this connection, the amphiphilic lipids or lipoids that form the double layer, the surfactant substance, and the active substance to be encapsulated, are stored individually, at a two-component or three-component mixture, in the form of the dry substances, in suitable vessels. The heterogeneous mixture is only formed shortly before administration, and pressed through a filter. Stability and storage problems of the liposomal suspension are thereby solved in very simple manner.

It was surprisingly found that the method according to the invention makes it possible to produce liposomes that demonstrate a transcutaneous effect, e.g. liposomes with analgesics, antiphlogistics, etc. The period of effect of an active substance encapsulated in a liposome is

extended not only as compared with the free active substance, but also in comparison with liposome preparations that were produced according to known methods, e.g. ultrasound treatment. The liposomes produced according to the invention therefore allow not only very high penetration of the active substance through the skin and mucous membranes, but at the same time, they also represent an improved system for controlled active substance release. For this effect, both the surfactant substance used in the formation of the liposomes and the type, form, or composition of the liposomes plays a decisive role.

The method according to the invention can be used independent of the size of the batches to be processed. Both batches on a laboratory scale, i.e. smaller than 2 ml, and batches on a large technical scale, in other words larger than 100 liters, can easily be processed. In this way, it is possible to obtain both highly concentrated and very homogeneous liposome suspensions, with the size of the liposomes being equally influenced by the absolute and relative concentrations and properties of the system components, e.g. by the molar ratio L/D of membrane components and surfactant substances, or by the nature of the encapsulated active substances, as by the environmental parameters, e.g. the pore diameter, excess pressure, or flow velocity, etc.

The following examples explain the present invention without limiting it.

Examples 1-9

1.5 g soy lecithin (98% phosphatidyl choline, PC) were dissolved in 1.5 ml abs. ethanol; different amounts of sodium cholate were dissolved in 27 ml 0.9% saline solution. The two solutions were combined, the mixture was subsequently passed through a sterile filter having a pore size of 0.22 μm at slight excess pressure (1-6 bar). The table shows the average diameter of the liposomes obtained, as a function of the molar ratio L/D of lipid to cholate.

Table

Example	L/D	Cholate total (mg)	Lipid concentration mg/ml	Cholate concentration mg/ml	Size nm ϕ
1	2.0	400	50	13.3	198
2	2.52	320	50	10.6	115.3
3	2.69	300	50	10.0	113.7
4	2.88	280	50	9.3	113.7
5	31.2	260	50	8.6	113.4
6	3.36	240	50	8.0	134.9
7	3.66	220	50	7.3	142.7
8	4.03	200	50	6.6	205.4
9	8.01	100	50	3.3	224.0

Preparation volume 30 ml; PC total 1500 mg, filter 0.22 μ m

Examples 10 and 11

The method of procedure was the same as above, but sodium deoxycholate was used as the surfactant substance. The lipid concentrations were 40 mg/ml ($L/D = 9.7$) or 88 mg/ml ($L/D = 4.0$). Liposomes having a size of 750 nm and 166.8 nm, respectively, were obtained.

Example 12

The method of procedure was the same as above, and 500 mg PC and 71 mg gramicidin ($L/D = 10.0$) as the surfactant substance were used.

Example 13

The method of procedure was the same as above, and 1500 mg PC and 100 mg stearyl amine ($L/D = 5.0$) as the surfactant substance were used.

Example 14

The method of procedure was the same as above, and 1500 mg PC and 100 mg hexadecyl trimethyl ammonium bromide ($L/D = 6.84$) as the surfactant substance were used.

Example 15-17

The method of procedure was the same as above, and the lipid concentrations were 50, 100, and 150 mg/ml, and Brij 56 (polyoxyethylene ether; 10 cetyl ether) was used in a concentration such

that the ratio L/D was 4.0, 5.0, 6.0, 7.3, 8.5 or 21.25.

Example 18

The following were filled into sterile vials with septum, in a cleanroom:

Vial 1: 50 ml amphotericin B + 41 mg Na-deoxycholate (corresponds to the composition that is commercially available)

Vial 2: 1000 mg pc, 100 mg Na-choleate

Vial 3: 1 ml absolute ethanol

Vial 4: 10 ml polar aqueous solvent, e.g. 0.9% saline solution, PBS (10 mM phosphate buffer, 0.9% NaCl), or water, sterile.

The 10 ml aqueous solvent are removed from vial 4 using a syringe, transferred to vial 1, and the active substance is dissolved. In the same manner, the ethanol is transferred from vial 3 to vial 2, and the lipid is dissolved with the Na-choleate. Once the dry substances have been dissolved in the respective solvents (time approximately 5 minutes), the active substance solution is drawn up into a syringe; subsequently, the dissolved lipid is drawn into the same syringe, and the heterogeneous basic mixture is formed by gentle shaking the syringe by hand and carefully moving the syringe plunger back and forth. Subsequently, a sterile filtration set, e.g. Minisart 0.22 µm pore diameter, and a cannula are set onto the syringe. The basic mixture is filtered directly into the corresponding infusion solution, e.g. 5% fructose solution, by way of a septum, with slight pressure, for subsequent intravenous administration.

The active substance used here, amphotericin B, is insoluble in water in the pH range 6-7, but can be dissolved using surfactant substances.

If active substances that are only slightly or not soluble in water, do not dissolve or do not dissolve in a sufficient amount in ethanol or an ethanolic lipid solution, and also do not dissolve in a sufficient amount with solution mediators and/or surfactant substances, in the manner described above, are supposed to be encapsulated liposomally in the same manner, such active substances are first dissolved in other organic solvents, e.g. methanol, chloroform, or mixtures of them, with or without surfactant substance, and transfers them to a vacuum rotation evaporator to dry them out. This process can also be continuous. By means of subsequent drying in a vacuum,

the last traces of organic solvent are quantitatively removed, and the dry substance is then filled into containers in portions.

Example 19

The following example is representative for all water-soluble active substances that can be filtered through filters having a pore size of 0.1-0.8 μm , preferably 0.15-0.3 μm . The following are filtered into vials:

Vial 1: 600 mg sodium ascorbate

Vial 2: 1000 mg PC + 150 mg Na-cholate

Vial 3: 1 ml absolute ethanol

Vial 4: 19 ml 0.9% saline solution

To dissolve the dry substances, the content of vial 4 is transferred to vial 1, the content of vial 3 to vial 2. Subsequently, the two solutions are drawn into a syringe, mixed in the syringe, and filtered through a filter set, e.g. Minisart 0.22 μm , with slight excess pressure.

Claims:

1. Method for the production of liposomes, characterized in that amphiphilic lipids or lipoids that form double layers, as membrane components, are combined, either dissolved in an organic solvent miscible with water, or as such with an aqueous solution of at least one surfactant substance that can also contain the active substance to be encapsulated, if necessary, and the heterogeneous mixture obtained in this manner is subsequently allowed to pass through a filter.
2. Method according to claim 1, characterized in that the membrane components are selected from among biological lipids, phospholipids, glycolipids, sphingolipids, or sterols.
3. Method according to at least one of claims 1 to 2, characterized in that the membrane components are selected from among phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl glycerin, phosphatidic acid, phosphatidyl serine, phosphatidyl inositol, cardiolipin, sphingomyelin, gangliosides, globosides, and cholesterol and its derivatives.
4. Method according to at least one of claims 1 to 3, characterized in that the surfactant substances are selected from among bile acids and their derivatives, glucosides, maltosides, thioglucosides, polyoxyethylene derivatives, pore-forming antibiotics, or lysophospholipids.
5. Method according to at least one of claims 1 to 3, characterized in that the surfactant substances are selected from among Na-cholate, Na-deoxycholate, Na-taurocholate, Na-glycocholate, Mega 10, Mega 9, Mega 8, octyl- β -thioglucoopyranoside, decyl, nonyl, octyl, heptyl, hexyl glucopyranoside, dodecyl or decyl- β -maltoside, Genapol X 080 X 100, X 150, C₁₂E₈, C₁₂E₉, tesside, Lubrol PX, Genapol C 100, Brij 35, Brij 56, Brij 76, Trikolal 8, lysophosphatidyl choline, lysophosphatidic acid, lysophosphatidyl ethanolamine, lysophosphatidyl glycerin.
6. Method according to at least one of claims 1 to 5, characterized in that the molar ratio L/D of membrane components (L) to surfactant substances (D) amounts to 2 to 20, preferably 2 to 6, particularly preferably 3.1 to 5.5.

7. Method according to at least one of claims 1 to 6, characterized in that the polar solvent is water, an aqueous or non-aqueous but associating solution.
8. Method according to at least one of claims 1 to 7, characterized in that the filtration takes place at a slight excess pressure, particularly 1 to 6 bar.
9. Method according to at least one of claims 1 to 8, characterized in that the pore size of the filter is 0.1-0.8 μm , preferably from 0.15-0.3 μm , and very particularly preferably 0.18-0.22 μm .
10. Method according to at least one of claims 1 to 9, characterized in that at least one of the usual ancillary substances or additives, preferably gel-forming agents, membrane stabilizers, or preservatives, is used.
11. Method according to at least one of claims 1 to 10, characterized in that in the absence of the active substance in the solution or suspension, encapsulation of the active substance into the liposomes takes place after their formation.
12. Method according to at least one of claims 1 to 11, characterized in that the liposomes are only produced shortly before administration, particularly at the location of use.
13. Use of the liposomes produced according to one of claims 1 to 12, particularly for reinforcing, accelerating, or otherwise optimizing the transport of liposomes and/or active substances through the skin, mucous membranes, or other barriers having an epithelial origin.

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die Herren Günther M a i e r h o f e r in 8000 München
und Gregor C e v c in 8011 Heinstetten haben eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung von Liposomen"

am 24. August 1990 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizufügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit dem am 24. August 1990 eingereichten Original überein.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 F 9/10 und A 61 K 9/127 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. November 1991

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Moget

Nummern: P 40 26 833.0

~~CONFIDENTIAL~~

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Liposomen, bei dem man doppelschichtbildende amphiphile Lipide bzw. Lipoide als Membrankomponenten entweder gelöst in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, oder als solche mit einer wässrigen Lösung einer randaktiven Substanz, die gegebenenfalls auch den zu verkapselnden Wirkstoff enthalten kann, kombiniert, und die so erhaltene heterogene Mischung anschließend durch eine Filter passieren läßt.

PATENTANWÄLTE

DR. V. SCHMIED-KOWARZIK
1956 - 1985

DR. P. WEINHOLD

DR. P. BARZ

MÜNCHEN

DIPL.-ING. G. DANNENBERG

DR. D. GÜDEL

DIPL.-ING. S. SCHNEIDER

Belegexemplar
Dan nicht geändert werden

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS

SIEGFRIEDSTRASSE 8

8000 MÜNCHEN 40

TELEFON: (0 89) 33 50 24

TELEGRAMME: WIRPATENTE

TELEX: 5 215 678 PAT D

FACSIMILE: (0 89) 39 23 33

Wd/Ri/Sz

Günther Maierhofer
Stöcklstr. 5a,
8000 München 60

und

Gregor Cevc
Gruberstr. 62
8011 Heimstetten

Verfahren zur Herstellung von Liposomen

14-000001

1

Verfahren zur Herstellung von Liposomen

1

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung und zur Verwendung am Ort von Liposomen, das auch im industriellen Maßstab angewendet werden kann.

5

Liposomen sind kugelförmige Vesikel aus einer oder mehreren Lipid-Doppelschichten mit einem wässrigen Kern. Aufgrund dieses Aufbaus sind die Liposomen nicht nur als Modellsysteme für das Studium biologischer Membranen, sondern auch als Träger für eine Vielzahl wasserlöslicher, amphiphiler und lipophiler Substanzen interessant, da solche Stoffe sowohl in das Vesikelinnere eingebracht wie auch an oder in die Vesikelfwand eingelagert werden können. Dem entsprechend erhält die Anwendung von Liposomen auf vielen Gebieten wie Medizin, Molekularbiologie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik und sogar Festkörpertechnologie eine zunehmende Bedeutung.

10

15

Für viele Anwendungen werden unter Umständen große Mengen an Liposomen benötigt, wobei zum Teil strenge Auflagen bezüglich Größe, Polydispersität, Ladung, biologischer und chemischer Verträglichkeit, Stabilität usw. gestellt werden. Außerdem sollten die Liposomenpräparationen nicht selten steril hergestellt und gehalten werden. Die meisten Herstellungsmethoden wurden jedoch für Laboratoriumszwecke entwickelt und sind vielfach nur schwer in einen großtechnischen Maßstab zu übertragen.

20

Zur Herstellung von Liposomen werden gegenwärtig drei verschiedene Grundverfahren angewendet.

25

Bei der sogenannten Detergenzmethode werden den die Membran ausbildenden Komponenten Detergenzien als Lösungsvermittler zugesetzt, wobei eine wasserlösliche Suspension vom Mischmizellen entsteht. Die Detergenzien werden dann durch diverse Verfahren, z.B. Dialyse, pH- oder Temperatursprung entfernt, wodurch die Vesikelbildung eingeleitet wird. Eine besondere Ausführungsform dieser Detergenzmethode wird in der EP 56 781 beschrieben und für die Herstellung von Liposomen im industriellen Maßstab vorgeschlagen. Jedoch ist die Verwendung von Detergenzien und ihre anschließende Entfernung aus der Suspension der Mischmizellen sehr material- und zeitaufwendig.

30

35

Bei den Injektionsmethoden werden Lösungen der doppelschichtbildenden Membrankomponenten in einem organischen Lösungsmittel, z.B. in Äther oder

24.08.99 15

1 Äthanol, in eine wässrige Lösung eingespritzt. Diese Methode ist jedoch
nicht zur Herstellung hochkonzentrierter Vesikelsuspensionen geeignet, und
da sich das organische Lösungsmittel nur unvollständig entfernen läßt,
verbleiben häufig biologisch bedenkliche Restanteile in der Präparation.
5 Ein weiterer Nachteil liegt darin, daß die erhaltenen Liposomensuspensionen
in der Regel sehr heterogen sind.

Bei den mechanischen Verfahren werden die Liposomen durch Schütteln, mehr
oder minder heftigem Mischen, Aufprall und/oder Ultraschallbehandlung von
doppelschichtbildenden Substanzen in heterogener wässriger Suspension er-
halten. Diese Verfahren sind jedoch meist energieaufwendig und wenig scho-
nend, sodaß sie leicht zu Überhitzung oder zu einem partiellen Abbau der
membranbildenden Substanzen oder der einzuschließenden Wirkstoffe führen
können. Die EP-A-102 324 als Beispiel eines solchen mechanischen Verfahrens
beschreibt den Einsatz anionischer oder kationischer Tenside, um die von
außen notwendige Energiezufuhr herabzusetzen, jedoch erfordert diese
15 Methode die vorherige Bildung eines dünnen Films aus Membrankomponenten
und Tensiden auf der Gefäßoberfläche, wodurch die Größe des Präparations-
ansatzes notwendigerweise beschränkt wird.

Die internationale Anmeldung WO 86/00238 beschreibt eine Technik zur
Produktion von Liposomen mit homogener Größenverteilung durch Extrusion
durch ein oder mehrere Filter. Die Methode eignet sich jedoch nur zur Auf-
trennung oder Fragmentierung von vorher gebildeten Liposomen. Sie erfordert
20 die Anwendung hoher Drucke und führt z.B. zu Lipidverlust und damit einher-
gehender Filterverstopfung.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzu-
stellen, mit dessen Hilfe es möglich ist, innerhalb kurzer Zeit und auf
einfache und schonende Weise auch große Mengen homogener, konzentrierter
und gegebenenfalls steriler Liposomensuspensionen herzustellen.
Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1
30 gelöst.

Bei den die Doppelschicht des Liposoms ausbildenden Membrankomponenten
handelt es sich ^{zweckmäßig} um amphiphile Lipide bzw. Lipidsubstanzen der allgemeinen
Grundstruktur X-Y, wobei X eine polare Kopfgruppe und Y einen apolaren
Rest darstellt. Typischerweise sind die Membrankomponenten Lipide, vor-
zugsweise aus der Gruppe der Phospholipide, z.B. Phosphatidyläthanolamin,
35 Phosphatidsäure, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylcholin, Phosphatidyl-
serin, Phosphatidylinositol; der Glykolipide, z.B. Ganglioside oder
Globoside und deren Sphingolipide, z.B. Sphingomyeline und Cerebroside.

Es sind jedoch für denselben Zweck auch künstlich hergestellte, in biologischen Systemen nicht auftretende Lipide oder Gemische solcher Lipide mit natürlichen verwendbar. Besonders erwähnenswert sind die zweikettigen Derivate, die eine Phosphat- oder Sulfatgruppe tragen, Moleküle, die an ein Disaccharid oder Oligosaccharid gekoppelt sind, Substanzen, die mit einem Oligopeptid verknüpft sind oder ein bzw. mehrere Polymerreste tragen (wie z.B. Polyoxyethylene).

Zur Herabsetzung der für die Vesikularisierung notwendigen Energie werden diese Membrankomponenten zusammen mit einer oder mehreren randaktiven Substanzen eingesetzt, die denselben strukturellen Grundtyp X-Y, wie hinsichtlich der Membrankomponenten oben angegeben, aufweisen. Für spezielle Ausführungsformen der Erfindung kann es somit vorkommen, daß doppelschichtbildende Membrankomponente und randaktive Substanz identisch sind, oder aber daß Membrankomponenten durch Zusatz von nichtlipoiden Substanzen randaktiv werden. Die Kopfgruppe solcher randaktiven Moleküle kann anionisch, kationisch, zwitterionisch oder nichtionisch sein. Die Verbindungen können sowohl einzeln als auch im Gemisch eingesetzt werden.

Beispiele für anionische Kopfgruppen sind Carboxylate, Sulfate, Sulfonate, usw.. Kationische Gruppen enthalten zumeist unterschiedliche Aminoderivate und Ableitungen von positiv geladenen Aminosäuren. Beispiele dafür sind z.B. Alkylammoniumbromid, Alkylmono- und dimethylsulfat, Lysin-derivate usw.. Der hydrophobe Teil besteht in der Regel aus Kohlenwasserstoffketten (z.B. Alkyl- oder Alkenoyl-, Acyl-, usw.), Steroiden oder ihren Substituenten, Cholanidopropyl-derivaten, Cholanen (Glykocholeat, Glykodesoxycholeat, Taurocholeat, Deoxycholeat usw.), und viele andere mehr. Sie können geradkettig, verzweigt, aliphatisch substituiert, gesättigt oder teilgesättigt sein. Zwitterionische Kopfgruppen enthalten sowohl positiv als auch negativ geladene Gruppen. Beispiele dafür sind Aminoalkoholester der Phosphatid-säure, entsprechende Thioverbindungen, Betaine, Sulfobetaine, entsprechende Aminosäurederivate, usw.. Auch viele Lysophospholipide gehören zu dieser Gruppe. Die Kopfgruppen der nichtionischen Amphiphile enthalten hauptsächlich Hydroxylgruppen und gehören z.B. den Klassen der Polyoxyethylene oder der Saccharide an. Die nichtionischen Gruppen sind typischerweise direkt (wie z.B. im Falle von Alkylglukosiden oder Alkylthioglukosiden und Glukamiden), oder über eine Ringstruktur (wie z.B. im Falle von Digitonin, Iriton, Tween, usw.) an den hydrophoben Teil gebunden.

Erfindungsgemäß lassen sich als randaktive Substanzen zweckmäßig folgende

14.000.000 7

1 Substanzklassen oder Abwandlungen davon einsetzen:
 Alkylglukoside, Alkylthioglukoside, Alkylmaltoside, Alkyldimethylaminooxide,
 Betaine und ihre quarternären Derivate, Digitonine oder Gallensäuren,
 Glukamide, diverse Substituenten von Polyoxyethylenen, CHAP- oder Big CHAP-
 5 Detergenzien, Lysolipide oder Lysophospholipide sowie amphiphile Oligo-
 und Polypeptide. Vertreter dieser Substanzklassen sind z.B. Polyoxyalkyl-
 äther (im Handel erhältlich z.B. unter der Bezeichnung Brij 35, Brij 56),
 Octaäthylenglykolmonododecyläther, Nonaäthylenglykolmonododecyläther, Cetyl-
 trimethylammoniumsalze, n-Octyl-N,N-Dimethylglycin, Dodecylmaltosid und
 10 -glukosid, Dodecyldimethylaminooxid, Polyoxyäthylenisotridecyläther, Poly-
 oxyäthylemonolauryläther, Decaoxyäthylemonolauryläther, Laurylsulfat,
 Digitonin, Big-CHAP, CHAPS, CHAPSO, Gramicidin, Mellitin, Polyoxyäthylen-
 lauryläther (m-Pigen PB), Polydocanol (Lubrol-PX), Octanoylmethylglukosid,
 Nonanoyl-N-Methylglukamid, Nonidet P-40, Alkylthioglukosid, Taurocholat-
 15 salze, Taurodeoxycholatsalze, Nonaäthylenglykol-Monododecyläther (Tessid),
 Nonaäthylenglykol-Octylphenoläther (Triton X-100), Heptaäthylenglykol-Octyl-
 phenyläther (Triton X-114), Lysolecithin, Lyso-Kephalin, Lyso-Phosphatid-
 säure, n-Octylsulfobetain und 3-Octyldimethylammoniumpropan-1-oleat
 (Zwittergent 3-16, 3-14, 3-12, 3-10, 3-Ox), Polyoxyäthylensorbitan-mono-
 20 oleat, Polyoxyäthylensorbitanmonolaurat, Pluronic F-127, und viele mehr.
 Eine weitere Gruppe, die jedoch demselben Grundtypus zugeordnet werden
 kann, sind Oligo- oder Polypeptide mit asymmetrischer Verteilung hydro-
 philer und hydrophober Teile. Zu dieser Gruppe gehören z.B. etliche Toxine
 und Porenbildner, wie z.B. Gramicidin, Amphotericin usw.. Vorzugsweise
 25 werden randaktive Substanzen aus biologischen Quellen oder biologisch un-
 bedenkliche Materialien eingesetzt; dazu gehören Gallensäuren und ihre
 Derivate, Gluko-, Malto- und Thioglukoside sowie Polyoxyäthylenderivate.
 Besonders bevorzugt sind Na-Cholat, Alkylglukoside, Polyoxyäthylenderivate,
 Sorbitol, Brij, Octyläthylenglykolmonododecyläther, Nonaäthylenglykolmono-
 30 lauryläther, Na-Deoxycholat, Dodecylmaltosid, m-Pigen PB, die Genapol-Reihe,
 sowie die Tween-Reihe. Sehr gut geeignet sind auch Big-CHAP, CHAPS und
 CHAPSO, Deoxy-Big-CHAP, Bis-(2-Äthylhexyl)-Natriumsulfosuccinat, Genaminox
 KC, Genapol X-80, X-100 und X-150, Lubrol PX, Mega-8, -9 und -10, N-P 40,
 Pluronic F-127, Na-Taurocholat, Tessid und peroxidfreie Triton-Detergenzien.
 35 In dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die Lipide bzw. Lipide als
 Membrankomponenten entweder als solche oder gelöst in einer geringen Menge
 eines geeigneten, mit Wasser mischbaren Lösungsmittels mit einer wässrigen

1 Lösung der randaktiven Substanzen kombiniert. Die wässrige Lösung kann außerdem Salze enthalten und z.B. eine physiologische Kochsalzlösung sein.

Gegebenenfalls können weitere übliche Zusatz- und Hilfsstoffe wie Membranstabilisatoren (z.B. Cholesterin, Tocopherol usw.), Konservierungsstoffe (z.B. Antioxydantien wie Ascorbinsäure oder Antibiotika), Farbstoffe, Riechstoffe, konsistenzändernde Mittel eingesetzt werden, die dem System zu jedem beliebigen Zeitpunkt entweder zusammen mit den Membrankomponenten und randaktiven Substanzen oder aber getrennt von ihnen
10 zugeführt werden können. Im Bedarfsfall können der liposomalen Suspension auch Gelbildner, z.B. Carbopol, Hestacerein PN 73, Tylose, Rhodigel usw., zugesetzt werden.

Die Vesikelbildung erfolgt, indem man die auf diese Weise erhaltene heterogene Mischung durch ein Filter passieren läßt. Das molare Verhältnis L/D von lipiden bzw. lipiden Membrankomponenten (L) zu randaktiven Substanzen (D) liegt hierbei zweckmäßig zwischen 1 und 20, bevorzugt zwischen 2 und 6, besonders bevorzugt zwischen 3,1 und 5,5. Bei zu niedrigen L/D-Werten werden Mischmizellen erhalten, bei L/D-Werten von größer als 20 steigt der zur Filtration nötige Druck stark an, und die so hergestellten Liposomen neigen zu Fusion und Aggregation. Man arbeitet vorzugsweise bei einem geringen Überdruck von 1 bis 6 bar. Der Porendurchmesser der Filter liegt zweckmäßig zwischen 0,1 und 0,8 µm, vorzugsweise zwischen 0,15 und 0,3 µm. Soll die Liposomenpräparation steril erhalten werden, so beträgt die obere Grenze des Porendurchmessers 0,22 µm.

Das Filtermaterial spielt hierbei kaum eine Rolle. So können z.B. Membranen aus Zelluloseacetat oder Zellulosenitrat, aus reiner Zellulose, aus Nylon, aus Polycarbonat, oder Membranen auf anorganischer Basis eingesetzt werden. Die Herstellungstemperatur wird der Nutz- und Trägerstoffwahl angepaßt und zweckmäßig liegt zwischen 0 und 95 °C. Vorzugsweise arbeitet man in einem Temperaturbereich von 18 - 70 °C; besonders bevorzugt für die Lipide mit fluiden Ketten ist der Temperaturbereich zwischen 18 und 38 °C, für die Lipide mit geordneten Ketten zwischen 45 und 60 °C.

Der pH-Wert liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 - 10. Vorzugsweise wird im pH-Bereich zwischen 5,5 und 8, besonders häufig zwischen 6,5 und 7,5 gearbeitet.

Die zu verkapselnden Wirkstoffe können dem System sofort zugefügt werden, sodaß ihr Einschluß spontan bei der Bildung der Liposomen erfolgt. Die

24.03.2017

1 Verkapselung der Wirkstoffe kann jedoch auch erst nach Herstellung der
Liposomen erfolgen, indem man die fertige Liposomenpräparation unter
mechanischer Agitation in ein den jeweiligen Wirkstoff oder die Wirk-
stoffkombination enthaltendes Lösungsmittel, vorzugsweise Wasser,
5 oder in einen flüssigen Wirkstoff selbst bringt. Die einzukapselnden
Wirkstoffe unterliegen keiner Beschränkung. Es können sowohl völlig
wasserlösliche als auch ganz unpolare fettlösliche Moleküle in die
Lipidvesikel eingeschlossen werden. Vorzugsweise werden jedoch mehr oder
weniger amphiphile Wirkstoffe in oder an die Vesikel gebracht, weil solche
10 die beste Stabilität gepaart mit einer optimalen Wirkung gewährleisten.
Die Wirkstoffe können beispielsweise aus dem Bereich der Arzneimittel, der
Diagnostika, der Kosmetika, oder aus biologisch aktiven Substanzen ausge-
wählt sein. Die Einschlußausbeute hängt sowohl von den Vesikelamphiphilen
als auch von den Wirkstoffen und sonstigen Systemkomponenten ab und kann
15 im Falle wasserlöslicher Substanzen über 80% und im Falle von fettlösli-
chen Substanzen bis zu 100% betragen. Wenn wasserunlösliche Substanzen nicht
direkt in die Lipiddoppelschicht der Liposomen eingebaut werden, kann das
Lipid- zu Nutzstoffverhältnis den Wert von 1 unterschreiten. Vorzugsweise
arbeitet man mit weniger als 50% der Nutzsubstanz, besonders bevorzugt
20 sind die Anteile unter 10% bezogen auf die Grundlipidsubstanz. Im Falle von
wasserlöslichen Substanzen kann der "Wirkstoff"-Anteil bis zu 40% betragen;
vorzugsweise arbeitet man mit weniger als 15%, besonders bevorzugt ist der
Anteil von einigen wenigen Prozent bezogen auf das Gesamtvolumen.
Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auch die sofortige Herstellung
der liposomalen Suspension (z.B. eines liposomalen Arzneimittels) direkt
am Ort der Anwendung (z.B. Klinik, Arztpraxis, Apotheke usw.) bzw. Verwen-
dung. Somit löst es etwaige Lagerungs- und/oder Stabilitätsprobleme der
liposomalen Suspension bzw. des Arzneimittels. Hierbei werden die doppel-
schichtbildenden amphiphilen Lipide bzw. Lipide, die randaktive Substanz
30 sowie der zu verkapselnde Wirkstoff einzeln, als Zwei- oder Dreikomponen-
tengemisch in Form der Trockensubstanzen in geeigneten Gefäßen gelagert.
Die heterogene Mischung wird erst kurz vor der Applikation gebildet und
durch ein Filter gepreßt. Stabilitäts- und Lagerungsprobleme der liposoma-
len Suspension werden dadurch auf sehr einfache Weise gelöst.
35 Es wurde überraschenderweise gefunden, daß das erfindungsgemäße Verfahren
die Herstellung von Liposomen ermöglicht, die transkutane Wirkung zeigen,
z.B. Liposomen mit Analgetika, Antiphlogistika usw.. Die Wirkungskdauer

1 eines liposomal verkapselten Wirkstoffs ist nicht nur gegenüber dem
freien Wirkstoff verlängert, sondern auch im Vergleich mit Liposomen-
präparationen, die nach bekannten Verfahren, z.B. Ultraschallbehandlung,
erzeugt wurden. Die erfindungsgemäß erzeugten Liposomen erlauben also
5 nicht nur eine sehr hohe Penetration des Wirkstoffs durch die Haut und
Schleimhäute, sondern sie stellen gleichzeitig auch ein verbessertes
System zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung dar. Für diese Wirkung
spielt sowohl die bei der Bildung der Liposomen eingesetzte randaktive
Substanz als auch die Art, Form, oder die Zusammensetzung der Liposomen
10 eine entscheidende Rolle.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist unabhängig von der Größe der zu ver-
arbeitenden Ansätze anwendbar. Es können sowohl Ansätze im Labormaßstab,
d.h. kleiner als 2 ml, als auch Ansätze im großtechnischen Maßstab, also
von größer als 100 Liter, bequem verarbeitet werden. Es ist auf diese
15 Weise möglich, sowohl hochkonzentrierte als auch sehr homogene Liposomen-
suspensionen zu erhalten, wobei die Größe der Liposomen gleichermaßen
durch die absoluten und relativen Konzentrationen und Eigenschaften der
Systembestandteile, z.B. durch das molare Verhältnis L/D von Membrankom-
ponenten und randaktiven Substanzen oder durch die Natur der verkapselten
20 Wirkstoffe, wie auch von den Umgebungsparametern, z.B. dem Porendurch-
messer, Überdruck, bzw. Fließgeschwindigkeit usw. beeinflußt wird.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die vorliegende Erfindung ohne sie
zu begrenzen.

Beispiele 1 - 9

1,5 g Sojalecithin (98 %iges Phosphatidylcholin, PC) wurden in 1,5 ml
Äthanol abs. gelöst; verschiedene Mengen an Natriumcholat wurden in 27 ml
0,9 % Kochsalzlösung gelöst. Beide Lösungen wurden vereint, die Mischung
30 anschließend bei geringem Überdruck (1-6 bar) durch ein Sterilfilter mit
0,22 µm Porengröße passieren gelassen. Die Tabelle zeigt den mittleren
Durchmesser der erhaltenen Liposomen in Abhängigkeit vom molaren Verhält-
nis L/D von Lipid zu Cholat.

24.08.2001

1 Tabelle

	Beispiel	L/D	Cholat total (mg)	Lipidkonz. mg/ml	Cholatkonz. mg/ml	Größe nm Ø
5	1	2.0	400	50	13.3	198
	2	2.52	320	50	10.6	115.3
	3	2.69	300	50	10.0	113.7
	4	2.88	280	50	9.3	113.7
10	5	3.12	260	50	8.6	113.4
	6	3.36	240	50	8.0	134.9
	7	3.66	220	50	7.3	142.7
	8	4.03	200	50	6.6	205.4
	9	8.1	100	50	3.3	224.0

15 Präparationsvolumen 30 ml; PC total 1500 mg, Filter 0.22 µm

Beispiele 10 und 11

Es wurde in gleicher Weise wie oben verfahren, jedoch wurde als randaktive Substanz Natriumdeoxycholat eingesetzt. Die Lipidkonzentrationen betrugen 40 mg/ml (L/D = 9.7) oder 88 mg/ml (L/D = 4.0). Es wurden Liposomen der Größe 750 nm bzw. 166.8 nm erhalten.

Beispiel 12

Es wurde wie oben verfahren, wobei 500 mg PC und als randaktive Substanz 71 mg Gramicidin (L/D = 10.0) eingesetzt wurden.

Beispiel 13

Es wurde wie oben verfahren, wobei 1500 mg PC und als randaktive Substanz 100 mg Stearylamin (L/D = 5.0) eingesetzt wurden.

Beispiel 14

Es wurde wie oben verfahren, wobei 1500 mg PC und als randaktive Substanz 100 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid (L/D = 6,84) eingesetzt wurden.

35 Beispiele 15 - 17

Es wurde wie oben verfahren, wobei die Lipidkonzentrationen 50, 100 und 150 mg/ml betrugen und als randaktive Substanz Brij 56 (Polyoxyäthylen-

- 1 äther; 10 Cetyläther) in einer Konzentration eingesetzt wurde, daß das Verhältnis L/D 4.0, 5.0, 6.0, 7.3, 8.5 oder 21.25 betrug.

Beispiel 18

- 5 In sterile Fläschchen mit Septum werden im Reinraum abgefüllt:

Fläschchen 1: 50 mg Amphotericin B + 41 mg Na-Deoxycholat (entspricht der sich im Handel befindlichen Zusammensetzung)

Fläschchen 2: 1000 mg PC, 100 mg Na-Cholat

Fläschchen 3: 1 ml Äthanol abs.

- 10 Fläschchen 4: 10 ml polares wässriges Lösungsmittel, z.B. 0.9% Kochsalz-lösung, PBS (10 mM Phosphatpuffer, 0.9% NaCl) oder Wasser, steril

- Mit einer Spritze werden die 10 ml wässriges Lösungsmittel aus Fläschchen 4 entnommen, in Fläschchen 1 überführt und der Wirkstoff gelöst. In gleicher Weise wird der Äthanol aus Fläschchen 3 in Fläschchen 2 überführt und das Lipid mit dem Na-Cholat gelöst. Sind die Trockensubstanzen in den jeweiligen Lösungsmitteln gelöst (Dauer ca. 5 Minuten), wird die Wirkstofflösung in eine Spritze aufgezogen, anschließend in die gleiche Spritze das gelöste Lipid und durch leichtes Schütteln von Hand oder vorsichtiges Hin- und Herbewegen des Spritzenkolbens die heterogene Grundmischung gebildet.
- 15 Auf die Spritze werden anschließend ein steriler Filtrationsvorsatz, z.B. Minisart 0.22 µm Porendurchmesser, und eine Kanüle aufgesetzt. Mit leichtem Druck wird die Grundmischung direkt über ein Septum in die entsprechende Infusionslösung, z.B. 5% Fructose-Lösung, zur anschließenden intravenösen Applikation filtriert.

- 20 Die hier verwendete Wirksubstanz Amphotericin B ist im pH-Bereich 6-7 wasserunlöslich, kann aber mit Hilfe von randaktiven Substanzen gelöst werden.

- Sollen Wirksubstanzen, die schwer oder nicht wasserlöslich sind, sich nicht
- 30 oder nicht in ausreichender Menge in Äthanol bzw. einer äthanolischen Lipidlösung lösen und sich auch nicht in ausreichender Menge mit Lösungsvermittlern und/oder randaktiven Substanzen in vorstehend geschilderter Weise lösen lassen, in gleicher Weise liposomal verkapselt werden, nimmt man solche Wirksubstanzen zunächst mit anderen organischen Lösungsmitteln,
- 35 z.B. Methanol, Chloroform oder Gemische davon, auf, mit oder ohne randaktive Substanz, und überführt sie an einem Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne. Dieses Verfahren kann auch kontinuierlich sein. Durch Nach-

1950-08-20

10

- 1 trocknung unter Vakuum werden letzte Spuren an organischem Lösungsmittel quantitativ entfernt, die Trockensubstanz dannportionsweise abgefüllt.

Beispiel 19

- 5 Das nachfolgende Beispiel ist stellvertretend für alle wasserlöslichen Wirkstoffe, die durch Filter mit Porengröße 0,1 - 0,8 μm , vorzugsweise 0,15 - 0,3 μm , filtrierbar sind. Es werden abgefüllt in:

Fläschchen 1: 600 mg Natriumascorbat

Fläschchen 2: 1000 mg PC + 150 mg Na-Cholat

- 10 Fläschchen 3: 1 ml Äthanol abs.

Fläschchen 4: 19 ml 0.9% Kochsalzlösung

Zum Lösen der Trockensubstanzen werden mit einer Spritze Inhalt von

Fläschchen 4 in Fläschchen 1 überführt, Inhalt von Fläschchen 3 in

Fläschchen 2. Anschließend werden beide Lösungen mit einer Spritze auf-

- 15 genommen, in der Spritzegemischt und mit leichtem Überdruck durch einen Filtrationsvorsatz, z.B. Minisart 0.22 μm , filtriert.

20

25

30

35

1 Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Liposomen, dadurch gekennzeichnet, daß
man doppelschichtbildende amphiphile Lipide bzw. Lipide als Membran-
komponenten entweder gelöst, in einem mit Wasser mischbaren organi-
schen Lösungsmittel, oder als solche mit einer wässrigen Lösung von
mindestens einer randaktiven Substanz, die gegebenenfalls auch
den zu verkapselnden Wirkstoff enthalten kann, kombiniert, und die
so erhaltene heterogene Mischung anschließend durch ein Filter
passieren läßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran-
komponenten ausgewählt sind aus biologischen Lipiden, Phospholipiden,
Glykolipiden, Sphingolipiden, oder Sterolen.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Membrankomponenten ausgewählt sind aus Phosphatidyl-
cholin, Phosphatidyläthanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidsäure,
Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol, Cardiolipin, Sphingomyelin,
Gangliosiden, Globosiden und Cholesterin und seinen Derivaten.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die randaktiven Substanzen ausgewählt sind aus Gallen-
säuren und ihren Derivaten, Glukosiden, Maltosiden, Thioglukosiden,
Polyoxyäthylenderivaten, porenbildenden Antibiotika oder Lysophospho-
lipiden.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die randaktiven Substanzen ausgewählt sind aus Na-Cholat,
Na-Deoxychololat, Na-Taurochololat, Na-Glykchololat, Mega 10, Mega 9, Mega 8,
Octyl- β -thioglukopyranosid, Heptyl- β -thioglukopyranosid, Decyl-, Nonyl-,
Octyl-, Heptyl-, Hexyl-Glukopyranosid, Dodecyl- oder Decyl- β -Maltosid,
Genapol X 080, X 100, X 150, $C_{12}F_8$, $C_{12}F_9$, Tessid, Lubrol PX, Genapol
C 100, Brij 35, Brij 56, Brij 76, Trikolal 8, Lysophosphatidylcholin,
Lysophosphatidsäure, Lysophosphatidyläthanolamin, Lysophosphatidyl-
glycerin.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekenn-
zeichnet, daß das molare Verhältnis L/D von Membrankomponenten (L) zu
randaktiven Substanzen (D) 2 bis 20, vorzugsweise 2 bis 6, besonders
bevorzugt 3,1 bis 5,5 beträgt.

- 1 7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das polare Lösungsmittel Wasser, eine wässrige oder nichtwässrige, jedoch assoziierende Lösung ist.
- 5 8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Filtration bei einem geringen Überdruck, insbesondere 1 bis 6 bar erfolgt.
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Porengröße des Filters 0,1 - 0,8 µm, insbesondere von 0,15 - 0,3 µm und ganz besonders bevorzugt 0,18 - 0,22 µm ist.
- 10 10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der üblichen Hilfs- oder Zusatzstoffe, vorzugsweise Gelbildner, Membranstabilisatoren oder Konservierungsmittel verwendet wird.
- 15 11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß bei Abwesenheit des Wirkstoffs in der Lösung oder Suspension die Einkapselung des Wirkstoffs in die Liposomen nach deren Bildung erfolgt.
- 20 12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen erst kurz vor der Applikation, insbesondere am Ort der Anwendung, hergestellt werden.
13. Verwendung der nach einem der Ansprüche 1 bis 12 hergestellten Liposomen, insbesondere zur Verstärkung, Beschleunigung oder sonstigen Optimierung des Transports von Liposomen und/oder Wirkstoffen durch die Haut, Schleimhaut oder andere Barrieren epithelialen Ursprungs.